

マウス亜種間コンソミック系統に基づくゲノム機能解析

●城石 俊彦¹⁾ ◆小出 剛²⁾ ◇高田 豊行¹⁾

情報システム研究機構国立遺伝学研究所系統生物研究センター 1) 哺乳動物遺伝研究室 2) マウス開発研究室

<研究の目的と進め方>

ゲノム科学は、ゲノム配列解読からゲノム機能解析のフェーズに移行している。ゲノム機能解析の成否は、ゲノム配列解読から明らかになった多数の遺伝子の機能をいかに効率よく抽出できるかにかかっている。このためには、遺伝子多型（遺伝的変異）と表現型の関連性を体系的に収集するアプローチが必要である。本研究では、進化的起源を異にする西ヨーロッパ産亜種マウス (*M.m.domesticus*) と日本産亜種マウス (*M.m.molossinus*) 由来の C57BL/6J と MSM/Ms の二つの系統間で染色体を1本ずつ置換したコンソミック (Consomic) 系統を用いて、マウスの個体レベルで現れる様々な複合量的形質 (Complex traits) を制御する単一因子や多因子を体系的にゲノム上にマップすることで原因遺伝子を同定するための解析系を開発することを目的とする。コンソミック系統は、全染色体についてマウス系統間で計画的に染色体置換を行い、それらの包括的な表現型解析によって高次機能や形態などの染色体マッピングを行うため、多因子であっても体系的なゲノムマッピングが可能である。また、永続的なリソースであるマウス系統をマッピングパネルとして使用するため、独立に得られた表現型マップデータを加算的に統合することができる。本研究では、この系を利用して実際のゲノム機能解析を実施する。並行して、基盤ゲノム支援班との連携研究で、MSM/Ms 系統の Whole Genome Shotgun (WGS) sequencing を行い、コンソミック系統の遺伝的背景となっている C57BL/6J 系統との間の SNP の検出を進め、ゲノム多型性と表現型多様性を繋ぐプラットフォームの構築へ向けた研究を推進する。

<当初研究計画>

・2005年度

1. マウス基準表現型のマッピング

体重、臓器重量、体長などの基準的な形態パラメータについて、各コンソミック系統の雌雄の成長曲線を作成する。下顎骨の計測を行い、多変量解析と画像データの数値解析によって両親系統の形態的差異を制御する遺伝因子の表現型マッピングを行う。

2. 代謝関連表現型のデータ収集

臨床生化学的パラメータである血中電解質 (Na, K, Cl)、グルコース (GUL)、尿素窒素 (BUN)、尿酸 (UA)、総コレステロール (TCHO)、中性脂肪 (TG)、総ビリルビン (TBIL)、総カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、総タンパク (TP)、アルブミン (ALB)、GOT、GPT、CPK、LDH、AMYL 等の各項目について、親系統である C57BL/6、MSM 系統の基礎データの収集を完成する。

3. 行動関連表現型の解析

親系統間で観察された自発活動量、不安特性、痛覚感受性に関して、テストバッテリーを用いたコンソミック系統の解析を行い、行動特性に関わる染色体を明らかにする。さらに長期学習記憶能力、社会性、攻撃性や向精神薬に対する感受性などの行動関連表現型を解析する新たなテストバッテリーを開発する。

4. MSM/Ms系統のcSNP情報の収集

コンソミック系統による責任遺伝子の探索では、親系統間の遺伝子上の塩基配列多型情報の有無が成否を左右する。このため、C57BL/6J と MSM/Ms の間の SNP 情報の収集を開始する。基

盤班の支援により MSM/Ms ゲノムの Whole Genome Sequencing を開始する。

・2006年度

1. 表現型マッピング

コンソミック系統を用いて下記の表現型を支配する遺伝子座の染色体マッピングを継続して行う。

(1) 形態学的特性 (身長、体重、成長曲線等) 及び皮下脂肪・内臓脂肪蓄積。

(2) 血液中の臨床生化学的パラメータ (血中電解質、糖代謝関連、脂質代謝関連)。

(3) 行動学的パラメータ (自発活動性、不安特性など)。

2. MSM/Ms系統のSNP情報の収集

基盤ゲノム支援班による MSM/Ms 系統の WGS プロジェクトと連携して C57BL/6J 系統に対する SNP 情報を収集する。さらに、*castaneus* 亜種由来の HMI/Ms、*domesticus* 亜種由来の PGN/Ms 系統、日本産愛玩マウス由来の JF1/Ms 系統の小規模な全ゲノム解読を基盤ゲノム支援班と連携して開始する。

3. 表現型を制御する遺伝子のマッピング

特に顕著な系統間差異が検出されたものについては、コンソミック系統による連鎖解析を開始する。

4. 表現型データベースの構築

各表現型の多様性情報を収集してコンソミック系統の表現型データベースを構築する。また、責任遺伝子探索の過程で作製したサブコンソミック系統や染色体組換え系統の表現型データを元に表現型マップデータを統合する。

・2007年度

1. コンソミック系統の表現型解析

前年度に引き続き、コンソミック全系統を対象にした表現型解析を行い、それらの表現型を規定する遺伝子 (群) の染色体マッピングを推進する。特に重点的に実施する表現型解析として、エネルギー代謝関連形質と行動特性形質を対象とする。具体的な表現型としては、以下の二つのカテゴリーがある。

(1) エネルギー代謝関連形質：脂質代謝関連の表現型としてマウスの組織ごとの体脂肪蓄積の測定を行う。また、糖代謝関連表現型として、さまざまな条件下の血糖値変動を測定する。また、糖負荷試験 (IPGTT) とインスリン負荷試験 (ITT) を行い、耐糖能とインスリン抵抗性についての表現型解析を実施する。

(2) 行動関連形質：マウス行動特性として、自発活動性と不安関連行動形質について、体系的に解析し、データ収集を継続する。

2. 表現型原因遺伝子の同定

染色体受容系統の B6 と顕著な表現型値を示すコンソミック系統については、当該系統と B6 系統の交配に基づいた高精度連鎖解析を実施して、原因遺伝子の同定を試みる。以下の表現型について、特定のコンソミック系統を用いた連鎖解析を開始する。

・体重、脂肪蓄積、血中脂質パラメータ・・・B6-Chr3^{MSM} 系統
・加齢および高脂肪食に依存した肥満形質・・・B6-Chr13^{TMSM} 系統
・不安関連行動形質・・・B6-Chr17^{MSM} 系統
・自発活動性・・・B6-Chr6^{CMSM} 系統
この目的で、コンソミック系統から更に細分化した領域のみを

有するサブコンソミック、コンジュニック系統を作出する。

3. MSM/Ms系統のSNP情報の収集

基盤ゲノム支援班と連携して、MSM/Ms系統のSNP情報のデータベースを完成させる。MSM/Ms系統以外の野生マウス由来系統についての小規模なゲノム解読を行い、標準的実験用系統であるB6のゲノム起源を明らかにする。

4. 表現型データベースの構築

表現型の記載方法やデータベースのフォーマットについて検討を行い、基盤ゲノム情報支援班と連携して表現型データベースの構築を開始する。

・2008年度

1. コンソミック系統の表現型解析

2007年度に引き続き、コンソミック全系統を対象とした表現型解析を行い、表現型を規定する遺伝子(群)の染色体マッピングを推進する。これまで重点的に実施したエネルギー代謝関連形質と行動特性形質に関しては原因遺伝子の同定を視野に解析を一層推進する。継続して収集する表現型は、以下のとおりである。

(1) 糖代謝関連表現型：さまざまな条件下での血糖値変動に関する表現型解析を行う。

(2) 脂質代謝関連表現型：脂質代謝産物の体系的な測定を行う。

(3) 行動関係表現型：行動特性として、自発活動性と不安関連行動形質について、体系的に解析する。また、疾患と関連した脳形態関連形質についても解析する。

2. 表現型責任遺伝子の同定

染色体受容系統のC57BL/6Jと顕著な表現型値を示す以下のコンソミック系統については、当該系統とC57BL/6J系統の交配に基づいた高精度連鎖解析とコンソミック系統から更に細かな領域のみを有するコンジュニック系統の作出を行い候補遺伝子領域の探索を行う。また、遺伝子多型解析、発現量比較や機能解析を通して原因遺伝子の同定を試みる。

- ・体重、脂肪蓄積、血中脂質パラメータ・・・B6-Chr3^{MSM}系統
- ・加齢および高脂肪食に依存した肥満・・・B6-Chr13^{TMSM}系統
- ・不安関連行動形質・・・・・・・・・・・・・・B6-Chr17^{MSM}系統
- ・自発活動性・・・・・・・・・・・・・・B6-Chr6^{CMSM}系統

3. MSM/Ms系統のSNP情報の解析

基盤ゲノム支援班と連携して構築したMSM/Ms系統のSNP情報データベースに対して新規機能の付与、データの拡充、他データベースとの連携を行う。特にMSM/Ms系統以外の野生マウス由来系統のゲノムデータの収集を行い、多様なマウス表現型に関する比較ゲノム情報を充実させる。

4. 表現型データベースの構築

表現型の記載方法やデータベースのフォーマットを検討し、オントロジーを考慮したデータ管理システムの構築を開始する。

・2009年度

1. コンソミック系統の表現型データの収集と責任遺伝子探索

下記の表現型について、該当するコンソミック系統とB6系統の交配による高精度連鎖解析を行い、責任遺伝子の候補領域の絞り込みを行う。

(1) エネルギー代謝関連表現型の責任遺伝子の探索：エネルギー代謝の「浪費型」を示すB6-Chr3^{MSM}系統、「節約型」を示すB6-Chr13^{MSM}系統を対象に、F2連鎖解析を拡大し責任遺伝子座領域を絞り込む。並行して各系統の責任領域をさらに細分化したコンジュニック系統を作製し、エネルギー代謝関連表現型の収集を行い、連鎖解析による結果を検証する。

(2) 行動関連表現型の責任遺伝子の探索：不安様行動の指標である危険評価行動に關与する可能性のある約50個の候補遺伝子について、その発現部位の解析・遺伝子内多型の解析・発現量の解析を進める。このため、既存のデータベースを駆使しつつ必要に応じて実験による解析を行う。また、網羅的に解析するためのマイクロアレイなどの実施についても検討する。様々な手法を駆使し

つつ、可能性の高い候補遺伝子については分子遺伝学的な手法によるノックアウト・ノックインマウスの作成も検討する。

2. MSM/Ms系統のSNP情報と表現型データを統合するデータベースの構築

本データベースは、国内外の関連データベースと共通の言語で定義付けできる構成とする必要がある。基盤ゲノム情報支援班との連携により、SNP情報および表現型データに関しては双方向で検索可能なデータベースを構築する。また、国内外のデータベースに対して適宜リンクを張る。

<研究期間の成果>

・2005年度

1. コンソミック生産システムの構築

通常飼育と精子・受精卵の凍結保存によるコンソミック系統維持条件の構築を行った。これに加えて、試験管内受精(IVF)などの発生工学的手法を用いて安定した生産システムを確立した。

2. 形態および代謝関連表現型データの収集

親系統であるC57BL/6J系統とMSM/Ms系統について体系的な表現形質の多様性データを収集した。重点項目として、一般的な臨床生化学的パラメータとして、血糖値などの糖代謝関連パラメータであるグルコース(GUL)、肝や腎機能のパラメータとなるような各種酵素活性であるGOT、GPT、CPK、LDH、AMYL、脂質代謝のパラメータである総コレステロール(TCHO)、中性脂肪(TG)、その他血中電解質(Na、K、Cl)、尿素窒素(BUN)、尿酸(UA)、総ビリルビン(TBIL)、総カルシウム(Ca)、無機リン(IP)、総タンパク(TP)、アルブミン(ALB)、等の各項目を測定した。また、体重や体長などの成長曲線、下顎骨などの骨格の形態学的特性の数値計測を行った。

3. 行動学的表現型データの収集

コンソミック系統の親系統であるMSM系統とC57BL/6系統には、行動表現型に顕著な違いが見られる事が明らかになっている。そこで、コンソミック系統を用いた行動表現型のスクリーニングを実施した。行動項目としては、自発活動性、情動性、痛覚感受性を解析対象とした。このために、ホームケージ活動性テスト、新規ケージ活動性テスト、明暗箱テスト、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路テスト、ホットプレートテスト、テールフリックテストなどの行動テストを各系統雌雄各15個体ずつに対して行った。コンソミック系統全体の約1/3程度に関して解析が終了し、いくつかの染色体を導入した系統が行動表現型に顕著な違いを示し、その染色体上に該当する行動表現型に關与する遺伝子が存在する事を示した。例えば、6番染色体上には自発活動性と情動性に關与する遺伝子が存在し、17番染色体上には不安などの情動性に關与する遺伝子が存在する事が判明した。更に1番染色体上には熱に対する痛覚に關与する遺伝子が存在することが明らかになった。

・2006年度

1. コンソミック系統による表現型の染色体マッピング

以下の表現型についてコンソミック系統を利用した染色体マッピングを実施した。

(1) 形態学的特性と脂肪蓄積：生後10週齢の個体を対象にして、形態学的パラメータの収集を行った。多くのコンソミック系統で体重に関する有意な差異が存在することが確認され、特に第3染色体コンソミック系統に顕著な低下が認められた。一方、体長、尾長、頭胴長等については、C57BL/6系統に比較して特に差異のあるコンソミック系統は認められなかった。これら形態学的特性の抽出から、脂肪蓄積をはじめとした、体重に影響をおよぼす量的形質を支配する染色体が多数判明した。さらに、各コンソミック系統の脂肪蓄積量の割合はC57BL/6J、MSM/Ms系統との比較においても有意な差異が存在し、皮下脂肪である背部、大腿部の白色脂肪組織、内臓脂肪である生殖腺、腎臓、腸間膜周囲の各白色脂肪組織の個別計測に關してもC57BL/6J系統と比較して

顕著な差異が認められた。このことから、脂肪蓄積に関する表現型は量的な制御のみならず蓄積部位についても遺伝的な制御を受け、蓄積部位を含めた脂肪蓄積制御因子が複数の染色体上にわたって存在していること示唆するものである。

(2) 血液生化学的パラメータ：生後10週齢、25週齢の個体を対象にして、血液生化学成分のデータ収集を行った。特に、脂肪代謝に係わるサイトカインであるアディポネクチンやレプチン、さらに糖代謝に係わるインスリンなどのパラメータを重点的に解析した。いずれのパラメータについても、コンソミック系統間に顕著な系統間差異が認められた。同様に、血中の脂質成分である総コレステロール、HDLコレステロール、トリグリセリドなどについても、表現型データの収集を行ったところ、同様に顕著な系統間差異が検出された。特に注目すべきは、複数のパラメータについて、コンソミック系統樹立に用いた両親系統（C57BL/6JやMSM/Ms）間の測定値を越えた血中濃度を示す系統が存在した点である。この結果は、当該血液成分の量的形質に対して、複数の遺伝子間の相互作用（エピスタシス）が存在する可能性を示している。

(3) 行動学的パラメータ：自発活動性、不安行動、痛覚感受性について複数の行動テストを用いて解析した結果、いずれの行動テスト項目においても、コンソミック系統間で有意な差が見られた。同じ行動性質を扱うテストでも、複数のテストに共通な遺伝因子に加え、テストごとに独自の遺伝的要因も関与していることが明らかになった。同時に、各行動パラメータについて、複数の染色体が表現型に関与しており、表現型を正または負に制御する複雑な様式を示すことが明らかになった。

2. MSM/Ms系統のSNP情報の収集

MSM/Ms系統のゲノムDNAのwhole genome shotgun (WGS) sequencingを行い、2006年12月までに、約1000万リードを解読し、1.2Xゲノムカバレッジのデータによる解析を行った。この厚みのゲノム配列データは、マウスゲノムのユニーク配列に対しておよそ75%をカバーしていることが判明している。さらに、C57BL/6系統のゲノム配列との比較によって、約973万個のSNPsを検出した。基盤ゲノム支援班と連携して、現在、SNP情報のデータベース化を進めている。これまでのところ、SNPデータから、C57BL/6Jゲノムのおよそ6%の領域ではMSM/Ms系統との高い相同性を示し、その領域が日本産亜種マウス由来である可能性が示された。

3. 表現型制御遺伝子のマッピング

コンソミック系統の表現型の染色体マッピングにより、形態学的特性や代謝関連表現型に顕著な差異を示す染色体が明らかになったので、これらの表現型を制御する遺伝子を明らかにするため、数種の系統について詳細な遺伝子座のマッピングを開始した。特に、体重、脂肪蓄積等について連鎖解析を行った。また、第6染色体上にC57BL/6系統の自発活動量を低下させ、不安行動を上昇させる強い効果を持つことが分かった。そこで、サブコンソミック系統を用いて詳細な遺伝子座のマッピングを行ったところ、第6染色体動原体付近には、自発活動量と不安行動に関わる遺伝子が複数存在し、染色体中間部分には自発活動量の調節に関わる遺伝子が存在することが分かった。

4. 表現型データベースの構築

表現型の記載方法やデータベースのフォーマットについて検討を行った。また、これまで得られている表現型データの集計を進めた。

・2007年度

1. コンソミック系統の表現型データの収集

遺伝的背景となっているB6系統と染色体供与系統であるMSM/Ms系統、並びに繁殖・維持が困難な系統を除いたコンソミック28系統に関して、体系的な表現型解析を行い、系統毎の表現型データを収集・解析した。以上の包括的な表現型収集によ

り、量的形質遺伝子座として、少なくとも雄で244座位、雌で218座位に昇る多数のQTLを検出することができた。このように、コンソミック系統を利用することで、多因子表現型を支配する遺伝子群について、個々の遺伝子座に分解して解析できることを明確に示すことができた。以下に、個別の二つの重点表現型の進捗状況をまとめて記す。

(1) エネルギー代謝関連形質：基礎的パラメータとして、体重・体長（経時変化を含む）、臓器重量、形態学的特性について測定を行った。次に、代謝関連形質として、脂肪蓄積、血中の臨床生化学パラメータ（コレステロール、中性脂肪、各種酵素など）についてデータを収集した。いくつかの系統については、糖負荷試験も実施した。この結果、エネルギー代謝関連形質において、重要な脂肪蓄積について詳細な表現型解析を実施して遺伝的背景であるB6系統と比較し顕著な違いを示すコンソミック系統を多数見出した。

(2) 行動関連形質：今年度で、コンソミック系統を用いた新規ケージテスト・ホームケージテスト・オープンフィールドテスト・明暗箱テスト・高架式十字迷路テスト・ホットプレートテスト・テールフリックテストによる自発活動性・不安様行動・痛覚感受性に関わる行動パターンのシステムティックな解析を終了し、効率よく行動関連遺伝子のマッピングを行うことに成功した。

2. 表現型原因遺伝子の同定

(1) 体脂肪蓄積の表現型解析によって、B6-Chr3^{MSM}系統は有意に脂肪蓄積に抵抗性を示すことが判明した。さらに、加齢、摂餌条件による肥満傾向に関連した表現型スクリーニングでは、B6-Chr13^{MSM}系統が高脂肪食に依存した顕著な肥満形質を呈することが明らかになった。以上の結果から、MSM/Ms系統の3番染色体上に脂肪蓄積抑制遺伝子、13番染色体遠位に高脂肪食に依存した脂肪蓄積促進遺伝子が存在することが明らかとなった。これらの表現型の原因となっている遺伝子の同定に向けて、両親系統について、当該コンソミック系統とB6系統とを交配して作製したF2個体による連鎖解析を行った。平行して該当コンソミック系統を利用した問題の遺伝領域を含むコンジェニック系統を作製した。

(2) コンソミック系統の中でも顕著な不安様行動の亢進を示すB6-Chr17^{MSM}について、17番染色体領域を14のブロックに分けて、それぞれを有するコンジェニック系統を作成した。これにより、不安様行動の指標である危険評価行動の増加に関わる染色体領域を6.5Mbの領域に絞り込むことに成功した。この領域内には、NCBIデータベースから約50個の遺伝子が見出されている。これらの遺伝子の中で、不安様行動に関与する可能性のある候補遺伝子について解析を進めた。

3. MSM/Ms系統のSNP情報の収集

基盤ゲノム支援班と連携して可能な限り広範囲のゲノム領域をカバーできる手法を選択した結果、本プロジェクトによるMSM系統ゲノムのWGS解読配列のB6系統の非リピート領域に対するカバー率は、当初の目的を超える80%に達した。得られたデータに関して、無作為に抽出した200か所以上の染色体領域のバリデーションを行い、本プロジェクトによるWGSが非常に高い品質を保持していることを確認した。80%のゲノム領域について両親系統の塩基配列を比較することにより、1,300万種以上もの候補SNPsを検出することができた。また、アミノ酸置換を起こすSNPを25,000種以上、遺伝子発現に関与する領域に存在するSNPを10万種近く同定することができた。また、基盤ゲノム情報支援班との連携により、これらの情報をデータベース化して公開した。塩基配列情報の比較から、標準的系統であるB6のゲノムには日本産マウス亜種のゲノムと極めて類似した領域が6%以上含まれることを確認した。さらに、MSM/Ms系統以外の野生マウス由来系統についての小規模なSNP収集を行った。これら

のデータと公共の SNP データを利用して、従来から示唆されていた汎用実験用マウス系統に対する日本産マウス亜種ゲノムの移入の実態に関する重要な知見を得た。

4. 表現型データベースの構築

米国 JAX 研究所が中心となり、主要な 40 種類のマウス系統の表現型を大規模に収集しデータベース化している Mouse Phenome Database (MPD) project、ノックアウトマウスを対象に体系的な表現型収集を行う European Mouse Disease Clinic (EUMODIC) プロジェクト等、世界的に進行しているマウス表現型のデータベースを参考に、現在コンソミック系統などで収集している表現型データの記載方法等を検討し、情報支援班との連携により、データベースの構成に反映した。

・2008 年度

1. コンソミック系統の表現型データの収集

コンソミック系統の遺伝的背景となっている B6 系統と染色体供与系統である MSM/Ms 系統、並びに繁殖・維持が困難な系統を除いたコンソミック 28 系統に関して体系的な表現型解析を行い、系統毎の表現型データを収集・解析した。以上の包括的な表現型収集により、量的形質遺伝子座として、多数の QTL を検出することができ、コンソミック系統を利用することで、多因子表現型を支配する遺伝子群について、個々の遺伝子座に分離して解析できることを国際誌に発表した。特に以下の二つの形質については詳細な表現型データを収集した。

(1) エネルギー代謝関連パラメータ：脂肪蓄積、血中の臨床生化学パラメータ（コレステロール、中性脂肪、各種酵素など）についてデータを収集し、エネルギー代謝関連形質の重要な脂肪蓄積について詳細な表現型解析を実施、B6 系統と比較し顕著な違いを示すコンソミック系統を見出した。

(2) 行動学的パラメータ：コンソミック系統をスクリーニングし、自発活動性や不安様行動に関して顕著な効果を有する染色体を明らかにした。その結果は国際誌に論文として発表した。更に狭い染色体領域を有する多数のサブコンソミック系統を解析し、自発活動に関わる遺伝子座を 6 番染色体と 3 番染色体、不安関連行動に関わる遺伝子座を 17 番染色体上の狭い領域に特定した。これらの領域について、さらに染色体組換え体を作製し領域の絞り込みを行うと同時に、候補遺伝子の発現解析を進めた。脳脊髄液の圧力調節異常により生じる水頭症の原因遺伝子座をゲノムワイドに解析し、そのうちの一つを 17 番染色体上の領域に新たにマッピングした。この結果は国際誌に発表した。

2. 表現型責任遺伝子の同定

体脂肪蓄積などの表現型解析によって、MSM/Ms 系統の 3 番染色体上に脂肪蓄積抑制遺伝子、13 番染色体遠位に高脂肪食に依存した脂肪蓄積促進遺伝子、17 番染色体領域に不安様行動の亢進に関連した遺伝子が存在することが明らかとなった。これらの表現型の原因となっている遺伝子の同定に向けて、両系統について、当該コンソミック系統と B6 系統とを交配して作製した F2 個体による連鎖解析、平行して該当コンソミック系統を利用した問題の遺伝領域を含むコンジュニック系統を作製した。特に MSM 系統の、13 番染色体遠位に存在する脂肪蓄積促進遺伝子に関してはその候補領域を 2Mbp にまで狭めることに成功した。

3. MSM/Ms 系統の SNP 情報の収集とデータベースの公開

NIG Mouse Genome Database に公共の SNP データを利用して解析したハプロタイプブロック情報などの新規データを追加した。

4. 表現型データベースの構築と公開

本研究の成果である C57BL/6 系統の遺伝的背景に MSM/Ms 系統の各染色体を導入した亜種間コンソミック系統についての表現型データベース [NIG Mouse Phenotype Database] を基盤ゲノム情報支援班との連携により構築して公開した。データベース構築においては、各種表現型を記述するためのタームについては、米

国 JAX 研究所が中心となり、主要な 40 種類のマウス系統の表現型を大規模に収集しデータベース化している Mouse Phenome Database (MPD) project と共通のものを使用している。また、ノックアウトマウスを対象に体系的な表現型収集を行う European Mouse Disease Clinic (EUMODIC) プロジェクト等、世界的に進行しているマウス表現型のデータベース等も参考にしている。本データベースは、本研究による表現型収集の進捗と密に連携しており、将来的にはデータ入力から各種表現型の表示および遺伝解析がオンタイムで実施可能な動的データベースを目指している。

・2009 年度

1. コンソミック系統の表現型データの収集とデータ統合

(1) エネルギー代謝関連パラメータ：これまでに脂肪蓄積など、エネルギー代謝関連形質の詳細な表現型解析を実施し、MSM/Ms 系統の 3 番染色体上に脂肪蓄積抑制遺伝子座、13 番染色体遠位に高脂肪食に依存した脂肪蓄積促進遺伝子座を特定した。特に、エネルギー代謝について「節約型」を示す B6-Chr13^{MSM} 系統を対象に、F2 連鎖解析を行うとともに責任領域をさらに細分化するため 11 種のサブコンソミック系統を樹立した。さらにエネルギー代謝関連表現型の収集からマップできた候補領域の遺伝子をカバーする MSM 系統の BAC クローン (Abe et al., Genome Res., 2004) を使用し、トランスジェネシスによる候補遺伝領域の B6 ゲノムへの導入を行った。これにより、当該遺伝領域が導入された系統およびコントロール系統のエネルギー代謝関連表現型の比較解析から、トランスジェネシスによる表現型模倣が行えるかどうかを検討した。

(2) 行動学的パラメータ：自発活動に関わる遺伝子座を 6 番染色体と 3 番染色体、不安関連行動に関わる遺伝子座を 17 番染色体上の狭い領域に特定し、更にその領域内の組換え体を作製することで高精度の遺伝的マッピングを進めた。絞込んだ領域内には、既にそれぞれ候補遺伝子を見出しており、その発現解析と機能解析を進めた。発現解析としては、リアルタイム定量 PCR 法により組織ごとに取り出した脳サンプルより RNA を抽出し、発現量の定量 PCR により解析した。その結果、候補遺伝子では B6 由来遺伝子と MSM 由来の遺伝子では発現量が異なることを明らかにした。また、機能解析としては、レンチウィルスをを用いて、脳内に候補遺伝子を導入して強制発現させる実験系を確立するための準備を進めた。また、BAC ゲノム DNA の遺伝子導入により、発現量の変化がどのように行動表現型に影響を与えるか調べるための実験を進めている。

2. MSM/Ms 系統の SNP 情報と表現型データを統合するデータベースの構築

本研究の進捗に合わせて、表現型データ、特に行動特性に関するデータ (Takahashi et al., Genes Brain Behav., 2008) を登録し公開した。SNP 情報と表現型データに関しては双方向で検索可能なシステムを構築するための統合ページを作成し公開した (<http://molossinus.lab.nig.ac.jp/>)。現在、ゲノムデータと表現型データをシームレスに繋ぐための仕組みを構築中である。

<国内外での成果の位置づけ>

米国の Nadeau & Lander らは、標準の実験用系統である A/J と C57BL/6J 系統の間でコンソミック系統を開発し、それらを用いた遺伝子機能解析系を構築している。これらの系統は、すでに研究コミュニティに公開され多面的な表現型解析が進行中である。また、チェコ共和国の Forejt らは、C57BL/6 系統の遺伝的背景に東ヨーロッパ産亜種 (*M. m. musculus*) マウス由来の PWD 系統の染色体を導入したコンソミック系統を樹立した。この系統においても、現在表現型解析がスタートしたところである。また、米国を中心として、標準的な近交系統の交配実験によりランダムに染色体を置換したりコンピナントインブレッド系統を 1000 系統作製しようという巨大計画が進行中である。これと合わせ

て、代表的な近交系統のゲノムを Re-sequencing するプロジェクトも進められており、ゲノム多型と系統間の表現型多様性を結びつけたゲノム機能解析計画が本格化しようとしている。しかし、多くの場合、使用する系統の遺伝的起源が明確では無く、その有効性については疑問が残る。我々は、染色体供与系統と受容系統の遺伝的差異が大きいほど、解析対象となる表現型の範囲が広がり、同時に遺伝解析も効率的になると考えて、亜種間でコンソミック系統を独自に開発した。また、染色体供与系統である MSM/Ms については、基盤ゲノム支援班により WGS が進行し、両親系統間の比較ゲノム解析により膨大な数の SNP 情報が利用可能となっている。このような状況から、マウス系統の遺伝的起源に関するデータを基盤としてゲノム機能解析を遂行しようという本研究は、コンソミック系統樹立の元になった親系統の遺伝的起源が離れているという理由により、他の類似解析系と比較して優れていると考えられる。このように、独自のリソースに立脚してゲノム解析を行う点に、本研究の独自性と優位性がある。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本プロジェクトが対象にした多様な表現型について、量的形質遺伝子座として多数の QTL を検出できたことから、コンソミック系統を利用することで、多因子表現型を支配する遺伝子群について、個々の遺伝子座に分離して解析できることを証明した。一方、エネルギー代謝表現型や行動関連表現型の責任遺伝子の探索では、有力な候補遺伝子はあるものの、これまでのところ責任遺伝子の特定までには至っていない。これは、絞り込んだ領域内にはまだ複数の機能遺伝子が残存しており、最終的な特定に予想以上の時間がかかったためである。特定のコンソミック系統を選択後、サブコンソミック系統を樹立するのに一定の時間を要することや、B6 および MSM/Ms 系統のゲノム多型情報がまだ完璧に整備できていないことがその一因である。このため、表現型を決定する最終的なゲノム多型 (SNP) を突き止めるには、もう一段階進んだアプローチが必要である。今後、サブコンソミック系統の樹立が進み、MSM/Ms 系統由来のさらに狭い染色体領域を持った系統が確立され、発生工学的手法を用いてこれらの安定した生産・供給システムが完備されることが必須である。これとゲノム情報整備の拡充と併せて、表現型の責任遺伝子の特定までの時間を短縮することが可能である。

MSM/Ms 系統のゲノム解析に関しては、支援班との連携によりユニーク領域での C57BL/6 系統との SNP に関してはほぼ網羅できたと考える。今後は、In/del およびこれ以外のゲノムコピー数多型 (CNV) も視野に入れたゲノム構造解析が必要になる。また、本プロジェクトの当初計画であった MSM/Ms 系統以外の *castaneus* 亜種由来の HMI/Ms 系統、*domesticus* 亜種由来の PGN/Ms 系統、日本産愛玩マウス由来の JF1/Ms 系統の SNP 情報の収集に関して、その進行が遅れた。これについては、野生由来系統選択のための PCR ベースの小規模なデータは 2007 年に収集しているが、昨今の SNP の高速・大量タイピング法、あるいは超並列型短鎖シーケンス法の動向を踏まえ、コスト対効果を考慮したデータ収集をおこなう必要性が生じたためである。

<今後の課題、展望>

本プロジェクトを通して、C57BL/6J 系統を遺伝的背景として、MSM/Ms 系統の染色体を導入したコンソミック (Consonic) 系統パネルを用いて、マウスの個体レベルで現れる様々な高次表現型を制御する単一/多因子を体系的にゲノム上にマップし、それらの責任遺伝子を同定するための解析系を開発することができた。その活用のための今後の課題は下記のとおりである。

1. 表現型責任遺伝子の同定に向けて

コンソミック系統パネルの解析基盤を最大限利用し、表現型から遺伝子多型 (ゲノム構造変化も含む) の同定までを迅速に行う

ことが可能となった。今後は、コンソミック系統および派生するサブコンソミック系統を永続的に効率良く維持する仕組みを整備し、自らの研究と研究コミュニティに供出する体制を整える必要がある。エネルギー代謝について「浪費型」を示す B6-Chr3^{MSM} 系統、「節約型」を示す B6-Chr13^{MSM} 系統を対象に、F2 連鎖解析を拡大し原因遺伝子座領域の絞り込み、さらには最終的な遺伝子同定を行うことは当面の課題である。また、行動関連表現型の責任遺伝子の探索についても、既に 17 番染色体上に存在する不安様行動に関わる遺伝子や 6 番染色体上の自発活動関連遺伝子は、その発現量解析や機能解析を進めている。このような行動関連遺伝子の機能を微妙に操作することで、行動表現型を改変することが可能になりつつある。しかし、コンソミック系統を用いたゲノムワイドなスクリーニングでは、これらの染色体以外にも、多数の染色体が不安様行動や自発活動性に関与していることを示している。これら他の遺伝子座についても解析を更に進めることで、行動多様性に関わる遺伝子をシステムティックに同定することが求められる。そのためには、これまで以上に効率の良い遺伝子同定に至る実験系の確立が必要である。

2. MSM/Ms 系統の SNP 情報と表現型データを統合するデータベースの構築に向けて

マウス機能ゲノムデータベースの完成をめざして、ゲノムデータベースと表現型データベースに関して、更なる機能追加、動的解析機能の追加を行う必要がある。また、新規の表現型収集を行った際も適宜データの追加が容易に行えるような改善が求められている。今後は、SNP 情報および表現型データに関して双方向で検索可能なデータベースを構築する予定である。また、新たな国内外のデータベースに対して適宜リンクを張ることも視野に入れたい。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文

1.0911141815

Takahashi, A., Tomihara, K., Shiroishi, T., and Koide, T.: Genetic mapping of social interaction behavior in B6/MSM consomic mouse strains, *Behavior Genet*, (in press).

2.0911141759

Umemori, J., Nishi, A., Lionikas, A., Sakaguchi, T., Kuriki, S., Blizard, D.A. and Koide, T.: QTL analyses of temporal and intensity components of home-cage activity in KJR and C57BL/6J strains, *BMC Genet*, 10:40 (2009).

3. 806111141

Takada, T., Mita, A., Maeno, A., Sakai, T., Shitara, H., Kikkawa, Y., Moriwaki, K., Yonekawa, H. and Shiroishi, T.: Mouse inter-subspecific consomic strains for genetic dissection of quantitative complex traits, *Genome Res*. 18, 500-508 (2008).

4.0807030851

Takahashi, A., Nishi, A., Ishii, A., Shiroishi, T., Koide, T.: Systematic analysis of emotionality in consomic mouse strains established from C57BL/6J and wild-derived MSM/Ms, *Genes, Brain and Behavior*, 7, 849-858 (2008).

5.0806112322

Takahashi, A., Shiroishi, T., and Koide, T.: Multigenic factors associated with a hydrocephalus-like phenotype found in inter-subspecific consomic mouse strains, *Mammal Genome*, 29, 333-338 (2008)

6.0812241434

Shigetani Y., Kasai S., Han W., Hata H., Nishi A., Takamatsu Y., Hagino Y., Yamamoto H., Koide T., Shiroishi T., Kasai K., Tsunashima K., Kato N., Ikeda K.: Association of morphine-induced antinociception with variations in the 5' flanking and 3'

untranslated regions of the opioid receptor gene in 10 inbred mouse strains. *Pharmacogenet. Genomics*, 18:927-936, (2008).

7. 0806261819
 Tanaka, S., Tamura, M., Aoki, A., Fujii, T., Komiyama, H., Sagai, T. and Shiroishi, T.: A new Gsdma3 mutation affecting anagen phase of first hair cycle. *Biochem Biophys Res Commun.* 359, 902-907 (2007)

8. 707211855
 Tamura M., Tanaka S., Fujii T., Aoki A., Komiyama H., Ezawa K., Sumiyama K., Sagai T. and Shiroishi, T.: Members of a novel gene family, Gsdm, are expressed exclusively in the epithelium of the skin and gastrointestinal tract in a highly tissue-specific manner. *Genomics*, 89, 618-629 (2007).

9. 702051724
 Oka, A., Aoto, T., Totsuka, Y., Takahashi, R., Ueda, M., Mita, M., Sakurai-Yamatani, N., Yamamoto, H., Kuriki, S., Takagi, N. et al.: Disruption of Genetic Interaction Between Two Autosomal Regions and the X Chromosome Causes Reproductive Isolation Between Mouse Strains Derived From Different Subspecies, *Genetics*, 175, 185-197 (2007).

10. 702051643
 Masuya, H., Sezutsu, H., Sakuraba, Y., Sagai, T., Hosoya, M., Kaneda, H., Miura, I., Kobayashi, K., Sumiyama, K., Shimizu, A. et al.: A series of ENU-induced single-base substitutions in a long-range cis-element altering Sonic hedgehog expression in the developing mouse limb bud, *Genomics*, 89, 207-214 (2007).

11. 606271032
 Takahashi, A., Kato, K., Makino, J., Shiroishi, T., and Koide, T.: Multivariate Analysis of Temporal Descriptions of Open-field Behavior in Wild-derived Mouse Strains, *Behavioral Genet*, 36, 763-774 (2006).

12. 606271040
 Taguchi, Y., Koide, T., Shiroishi, T., Yagi, T.: Molecular evolution of Cadherin-related neuronal receptor/protocadherin (CNR/Pcdh) gene cluster in *Mus musculus* subspecies, *Mol. Biol. Evol.*, 22, 1433-1443 (2005).

13. 601301437
 Ogasawara M., Imanishi T., Moriwaki K., Gaudieri S., Tsuda H., Hashimoto H., Shiroishi T., Gojobori T., and Koide T.: Length variation of CAG/CAA triplet repeats in 50 genes among 16 inbred mouse strains, *Gene*, 349, 107-119 (2005).

2) <学会発表>

1. Takada T., Mita A., Ebata T., Shin-I T., Toyoda A., Fujiyama A., Kohara Y., Obata Y., Moriwaki K., Yonekawa H., Shiroishi T. Genetic dissection of age-associated phenotypes using intersubspecific consomic strains. 23th International Mammalian Genome Conference, 2009. 11.1-4, La Jolla, USA.

2. Umemori, J., Uno, T., Yuasa, S., Koide, T.: Decreased expression of myelination associated genes in genetic incompatibility mice, Genic mice. 23rd International Mammalian Genome Conference, La Jolla Torrey Pines, California, November 1-4, 2009.

3. Takada, T. Making a database to link mouse genome diversity and phenotype Symposium in International Phenome Integration Meeting RIKEN/InterPhenome/CASIMIR, 2009. 7.12-13, Shiga, Japan.

4. 高田豊行, 江端俊伸, 小原雄治, 城石俊彦. NIG Mouse Functional Genomics Database. 文科省統合データベースプロジェクト「データベースが拓くこれからのライフサイエンス」2009, 6.12, 東京

5. Sugimoto, H., Takahashi, A., Shiroishi, T., Koide, T.: Molecular and genetic analysis for aggressive behavior using B6-MSM consomic mouse strains. 11th Annual Meeting of the International Behavioural and Neurogenetics Society, Dresden, June 4-8, 2009.

6. Takada T., Ebata T., Shin-I, Narita T., Abe K., Sakaki Y., Toyoda A., Obata Y., Moriwaki K., Kohara Y., Shiroishi T. Two wave intersubspecific introgression built up genome framework of the classical laboratory mouse strains. 22th International Mammalian Genome Conference, 2008. 11.2-5, Prague, Czech Republic.

7. Takahashi, A., Sugimoto, H., Kimura, S., Tomihara, K., Tsuchiya, T., Kakihara, S., Tanemura, M., Shiroishi, T., Koide, T.: Complex genetic architecture of social interaction and aggressive behavior clarified using consomic strains derived from MSM and C57BL/6. 22nd International Mammalian Genome Conference, Prague, November 2-5, 2008.

8. Takada, T., Mita, A., Maeno, A., Moriwaki, K., Yonekawa, H., Shiroishi, T. Mouse inter-subspecific consomic strains uncovers additive and non-additive genetic effects on complex traits. 22th International Mammalian Genome Conference, 2008. 11.2-5, Prague, Czech Republic.

9. Takada, T., Mita, A., Moriwaki, K., Yonekawa, H., Shiroishi, T. Mouse inter-subspecific consomic strains for the study of energy metabolism-related traits. CBI Annual Meeting 2008 International Symposium, 2008. 10.22-24, Tokyo, Japan.

10. Takahashi, A., Shiroishi, T., Koide, T.: Fine genetic mapping of emotionality-related traits on distal end of mouse chromosome 17., 10th Annual Meeting of the International Behavioural and Neural Genetics Society, Portland, May 5-9, 2008.

11. Takada, T., Ebata, T., Narita, T., Shin-I, T., Abe, K., Sakaki, Y., Toyoda, A., Sagai T., Mita, A., Moriwaki, K., Kohara, Y. and Shiroishi, T. Whole genome shotgun sequencing of M. M. Molossinus-derived MSM/Ms and detection of vast amount of SNPs against C57BL/6. 21th International Mammalian Genome Conference, 2007. 10.28-11.1, Kyoto, Japan.

3) <図書>

高田豊行, 城石俊彦: マウスの比較ゲノム, 日本産マウス系統のゲノム解読とコンソミック系統の樹立. 細胞工学別冊, 比較ゲノム学から読み解く生命システム (監修, 藤山秋佐夫) 秀潤社 pp.97-104, 2007.

4) <データベース>

1. 0911161320
 データベース名: NIG Mouse Phenotype Database (NIGマウス表現型DB), URL: <http://molossinus.lab.nig.ac.jp/phenotype/index.html>

2. 0911161331
 データベース名: NIG Mouse Genome Database (NIGマウスゲノムDB), URL: <http://molossinus.lab.nig.ac.jp/msmdb/>

5) <研究成果による産業財産権の出願・取得状況> なし。

6) <新聞発表、その他顕著なもの> なし。